

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620120153467

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

口服降血糖药物纳米载体系统的研究

Studies on nanocarrier systems loaded with antidiabetic drugs
for oral delivery

于 飞

指导教师姓名: 陈 晓 东 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2015 年 8 月

论文答辩时间: 2015 年 9 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席:_____

评 阅 人:_____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
ABSTRACT	II
第一章 文献综述	1
1.1 引言	1
1.2 口服药物递送概述	1
1.3 胰岛素简介	1
1.3.1 口服胰岛素的优势及问题.....	4
1.3.1.1 口服胰岛素的优势.....	4
1.3.1.2 口服胰岛素的问题.....	5
1.3.1.3 化学屏障.....	5
1.3.1.4 酶屏障.....	5
1.3.1.5 吸收屏障.....	6
1.3.2 口服胰岛素纳米粒的种类.....	7
1.3.2.1 壳聚糖口服胰岛素纳米粒.....	7
1.3.2.2 聚乳酸-羟基乙酸共聚物口服胰岛素纳米粒	8
1.3.2.3 脂质体口服胰岛素纳米粒.....	9
1.4 黄连素简介	10
1.4.1 药理作用.....	11
1.4.1.1 降血糖.....	11
1.4.1.2 抗心律失常.....	11
1.4.1.3 降血压.....	11
1.4.1.4 抗肿瘤.....	12
1.4.1.5 治疗消化道疾病.....	12
1.4.2 BER 面临的吸收问题.....	12
1.5 基于大豆卵磷脂的纳米载体系统	12
1.5.1 聚合物磷脂杂化纳米粒.....	13
1.5.2 磷脂复合物纳米粒.....	14
1.5.2.1 磷脂复合物的理化表征以及复合机制.....	17

1.5.2.2 磷脂复合物的制备工艺.....	18
1.6 本课题研究内容	19
1.6.1 本课题的目的和意义.....	19
1.6.2 本课题的主要研究内容.....	19
参考文献	20
第二章 胰岛素聚合物磷脂杂化纳米粒的制备	32
2.1 引言	32
2.2 实验材料和实验器材	33
2.2.1 实验材料.....	33
2.2.2 实验仪器.....	34
2.3 实验方法	34
2.3.1 检测方法的建立.....	34
2.3.1.1 色谱条件.....	34
2.3.1.2 专属性.....	34
2.3.1.3 标准曲线.....	35
2.3.1.4 精密度.....	35
2.3.1.5 加样回收率.....	35
2.3.2 INS-PLGA-lipid-PEG NPs 的制备	35
2.3.3 制备方法的单因素考察.....	36
2.3.4 包封率的测定.....	36
2.3.5 粒径和电位的测定.....	36
2.3.6 形貌观察.....	36
2.3.7 喷雾冷冻制备工艺.....	37
2.3.8 冻干保护剂浓度.....	37
2.3.9 长期稳定性.....	37
2.4 实验结果与讨论	37
2.4.1 检测方法的建立.....	37
2.4.1.1 标准曲线.....	38
2.4.1.2 专一性评价.....	38
2.4.1.3 回收率和日内日间精密度.....	39
2.4.1.4 加样回收率及精密度.....	40
2.4.2 制备工艺的优化.....	41

2.4.3 影响制备的因素.....	42
2.4.3.1 聚合物种类.....	42
2.4.3.2 聚合物浓度.....	43
2.4.3.3 超声时间.....	44
2.4.3.4 油相水相比例.....	45
2.4.3.5 搅拌挥发时间.....	46
2.4.4 最佳制备工艺.....	46
2.4.5 理化性质的表征.....	47
2.4.5.1 透射电镜（TEM）表征.....	47
2.4.5.2 粒径和粒度分布.....	47
2.4.5.3 zeta 电位.....	48
2.4.6 体外释放行为.....	50
2.4.7 X-射线衍射图.....	51
2.4.8 喷雾冷冻干燥.....	52
2.4.9 复溶后粒径、电位、形貌.....	53
2.4.10 长期储存稳定性.....	55
2.4.11 复溶后体外释放稳定性.....	56
2.5 本章小结.....	57
参考文献.....	58
第三章 INS-PLGA-lipid-PEG NPs 的体内外评价.....	60
3.1 引言.....	60
3.2 材料和仪器.....	60
3.2.1 实验试剂.....	60
3.2.2 实验仪器.....	61
3.3 实验方法.....	61
3.3.1 实验溶液的配制.....	61
3.3.2 FITC 标记胰岛素.....	62
3.3.3 细胞摄取共聚焦显微镜观察.....	62
3.3.4 细胞摄取流式分析.....	62
3.3.5 细胞毒性的考察.....	63
3.3.6 体内评价.....	63
3.3.6.1 糖尿病 SD 大鼠模型的建立.....	63

3.3.6.2 大鼠药效学研究.....	64
3.3.6.3 大鼠药动学研究.....	64
3.4 实验结果与讨论	64
3.4.1 细胞毒性实验.....	64
3.4.2 细胞摄取.....	65
3.4.4 细胞摄取流式检测.....	66
3.4.5 大鼠药效学考察.....	68
3.4.6 大鼠药代动力学考察.....	70
3.4.7 DSPE-PEG ₂₀₀₀ -FA 的合成与表征	72
3.5 本章小结	75
参考文献	76
第四章 黄连素磷脂复合物的制备	78
4.1 引言	78
4.2 仪器与试剂	78
4.2.1 实验仪器.....	79
4.2.2 实验试剂.....	79
4.3 BER 检测方法的确定	80
4.3.1 检测波长的选择.....	80
4.3.2 色谱条件.....	80
4.3.3 专属性.....	80
4.3.4 标准曲线.....	81
4.3.5 精密度.....	81
4.3.6 回收率.....	81
4.3.7 黄连素磷脂复合物的制备方法.....	81
4.3.8 制备工艺的单因素考察.....	82
4.3.8.1 反应溶剂.....	82
4.3.8.2 旋蒸温度.....	82
4.3.8.3 药物和磷脂比例.....	82
4.3.9 扫描电镜观察.....	82
4.3.10 DSC 测定.....	82
4.3.11 X-射线衍射	82
4.3.12 傅里叶变换红外分析.....	83

4.4 实验结果与讨论	83
4.4.1 BER 检测波长的确立	83
4.4.2 专属性	83
4.4.3 日内、日间精密度	84
4.4.4 加样回收率	85
4.4.5 反应试剂的选择	85
4.4.6 BER 与磷脂比例的选择	86
4.4.7 旋转蒸发温度的选择	87
4.4.8 扫描电镜	87
4.4.9 差式扫描量热分析	90
4.4.10 X-射线衍射分析	90
4.4.11 红外光谱分析	91
4.5 本章小结	94
参考文献	95
第五章 黄连素磷脂复合物纳米粒的制备及体内外评价	97
5.1 引言	97
5.2 仪器和试剂	98
5.2.1 仪器	98
5.2.2 试剂	98
5.3 实验方法与表征	99
5.3.1 P-BER 的制备	99
5.3.2 包封率	99
5.3.3 粒径和电位	100
5.3.4 形貌观察	100
5.3.5 喷雾干燥工艺	100
5.3.6 长期稳定性	100
5.3.7 药代动力学	100
5.3.8 空白载体细胞毒性	101
5.3.9 细胞摄取	101
5.3.10 细胞摄取流式测定	101
5.3.11 P-BER 的药效学	101
5.3.12 TG 含量的测定	102

5.3.13 油红染色.....	102
5.3.14 HE 染色	102
5.4 结果和讨论	102
5.4.1 透射电镜.....	102
5.4.2 粒径和粒度分布.....	103
5.4.3 zeta 电位测定	104
5.4.4 体外释放.....	104
5.4.5 喷雾干燥.....	105
5.4.6 复溶后理化性质的测定.....	106
5.4.7 长期储存稳定性的检测.....	108
5.4.8 体外释放稳定性检测.....	109
5.4.9 细胞毒性.....	110
5.4.10 激光共聚焦观察细胞摄取.....	111
5.4.11 细胞摄取定量分析.....	112
5.4.12 口服药代动力学考察.....	114
5.4.13 小鼠药效学考察.....	118
5.5 本章小结	118
参考文献	120
第六章 结论和展望	122
6.1 结论	122
6.2 展望	123
科 研 成 果	124
致 谢	125

Table of contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Literature review	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Introduction of oral drug delivery.....	1
1.3 Introduction of insulin.....	1
1.3.1 Challenges to oral insulin delivery	4
1.3.1.1 Advantages of oral insulin delivery	4
1.3.1.2 Barriers to oral insulin delivery	5
1.3.1.3 Chemical barrier.....	5
1.3.1.4 Enzymatic barrier.....	5
1.3.1.5 Absorption barrier.....	6
1.3.2 Nanoparticles as insulin delivery systems	7
1.3.2.1 Chitosan nanoparticles for oral insulin delivery	7
1.3.2.2 PLGA nanoparticles for oral insulin delivery	8
1.3.2.3 Solid lipid nanoparticles for oral insulin delivery.....	9
1.4 Introduction of berberine.....	10
1.4.1 Pharmacological effects of the berberine.....	11
1.4.1.1 Hypoglycemic action	11
1.4.1.2 Anti-arrhythmia effect.....	11
1.4.1.3 Antihypertensive effect	11
1.4.1.4 Anti-tumor effect.....	12
1.4.1.5 Treatment of gastrointestinal diseases	12
1.4.2 Challenges to oral berberine delivery	12
1.5 Lipid based nanocarriers	12
1.5.1 Lipid-enveloped polymeric nanoparticle for drug delivery	13
1.5.2 Phospholipid complex.....	14
1.5.2.1 The exploration of the formation mechanism.....	17
1.5.2.2 Studies on the preparation of the phospholipid comple.....	18
1.6 Objectives and main contents of this thesis	19

1.6.1 Objectives	19
1.6.2 Main contents	19
References	20
Chapter 2 Preparation of INS-PLGA-lipid-PEG NPs	32
2.1 Introduction	32
2.2 Experimental Materials and Equipments	33
2.2.1 Experimental Materials	33
2.2.2 Experimental Equipments	34
2.3 Methods	34
2.3.1 Detemination method	34
2.3.1.1 Chromatographic condition	34
2.3.1.2 Specificity evaluation	34
2.3.1.3 Standard curve	35
2.3.1.4 Precision test	35
2.3.1.5 Method recovery test	35
2.3.2 Preparation of INS-PLGA-lipid-PEG NPs	35
2.3.3 Schematic illustration of the process of the preparation	36
2.3.4 Monofactor investigation	36
2.3.5 Determination of the entrapment efficiency	36
2.3.6 TEM image of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	36
2.3.7 Spray freeze drying of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	37
2.3.8 Selection of added amount of PVA	37
2.3.9 The storage stability test of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	37
2.4. Results and discussion	37
2.4.1 Detemination method of insulin content	37
2.4.1.1 Standard curve	38
2.4.1.2 Specificity evaluation	38
2.4.1.3 Method recovery test	39
2.4.1.4 Method precision test	40
2.4.2 Monofactor investigation	41
2.4.3 The preparation of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	42
2.4.3.1 Investigation of the kind of the polymers	42

2.4.3.2 Investigation of the concentration of the polymer	43
2.4.3.3 Investigation of the concentration of different ultrasonic time...	44
2.4.3.4 Investigation of the concentration of organic-aqueous phase	45
2.4.3.5 Investigation of the concentration of the volatile time	46
2.4.4 The preparation of the optimized INS-PLGA-lipid-PEG NPs	46
2.4.5 Studies on the preparation of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	47
2.4.5.1 TEM image of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs.....	47
2.4.5.2 Particle size	47
2.4.5.3 Zeta potential	48
2.4.6 In vitro time-dependent release.....	50
2.4.7 X-ray diffraction (XRD) patterns.....	51
2.4.8 Preparation of micro-particles@INS-PLGA-lipid-PEG NPs	52
2.4.9 The determination of the hydrated particle size	53
2.4.10 In vitro long-term storage stability	55
2.4.11 In vitro time-dependent drug release of INS.....	56
2.5 Summary	57
References	58
Chapter 3 In vitro and vivo evaluation of the INS-PLGA-lipid-PEG NPs	60
3.1 Introduction	60
3.2 Experimental Materials and Equipments	60
3.2.1 Experimental Materials.....	60
3.2.2 Experimental Equipments.....	61
3.3 Methods	61
3.3.1 Preparation of the PBS solution.....	61
3.3.2 Preparation of the FITC labeled INS	62
3.3.3 In vitro cellular uptake	62
3.3.4 Flow cytometer analysis	62
3.3.5 In vitro cell viability.....	63
3.3.6 Study in diabetic rat	63
3.3.6.1 Induction of diabetic rats	63
3.3.6.2 In vivo pharmacodynamics	64
3.3.6.3 In vivo pharmacokinetics	64

3.4. Results and discussion	64
3.4.1 In vitro cell viability	64
3.4.2 In vitro cellular uptake	65
3.4.4 In vitro cell viability	66
3.4.5 In vivo pharmacodynamics	68
3.4.6 In vivo pharmacokinetics	70
3.4.7 Synthesis of DSPE-PEG-FA	72
3.5 Summary	75
References	76
Chapter 4 Preparation of berberine phospholipid complex	78
4.1 Introduction	78
4.2 Experimental Materials and Equipments	78
4.2.1 Experimental Equipments	79
4.2.2 Experimental Materials	79
4.3 Detemination method of berberine content	80
4.3.1 Determination of the waveleng of the berberine	80
4.3.2 Chromatographic condition	80
4.3.3 Specificity evaluation	80
4.3.4 Standard curve	81
4.3.5 Method precision test	81
4.3.6 Method recovery test	81
4.3.7 The preparation of berberine phospholipid complex	81
4.3.8 Monofactor investigation	82
4.3.8.1 The effects of different solvents	82
4.3.8.2 The effects of different rotary evaporation temperature	82
4.3.8.3 The effects of different mass ratio of BER to phospholipid	82
4.3.9 SEM image	82
4.3.10 DSC spectrum of berberine phospholipid complex	82
4.3.11 XRD spectrum of berberine phospholipid complex	82
4.3.12 FTIR spectra of the berberine phospholipid complex	83
4.4 Results and discussion	83
4.4.1 Determination of the waveleng of the berberine	83

4.4.2 Specificity evaluation.....	83
4.4.3 The precision result of determined BER within-day	84
4.4.4 Method precision test and recovery test.....	85
4.4.5 The effects of different solvents.....	85
4.4.6 The effects of different mass ratio of BER to phospholipid	86
4.4.7 The effects of different rotary evaporation temperature	87
4.4.8 SEM image of the berberine phospholipid complex.....	87
4.4.9 DSC spectrum of berberine phospholipid complex	90
4.4.10 XRD spectrum of berberine phospholipid complex	90
4.4.11 FTIR spectra of the berberine phospholipid complex.....	91
4.5. Summary.....	94
References.....	95
Chapter 5 In vitro and vivo evaluation of the microparticles@P-BER	97
5.1 Introduction.....	97
5.2 Experimental Materials and Equipments.....	98
5.2.1 Experimental Equipments.....	98
5.2.2 Experimental Materials.....	98
5.3 Methods.....	99
5.3.1 Preparation of the P-BER.....	99
5.3.2 Determination of the entrapment efficiency	99
5.3.3 Particle distribution and zeta value of the P-BER	100
5.3.4 TEM image of the the P-BER.....	100
5.3.5 Spray drying of the P-BER	100
5.3.6 The storage stability test of the P-BER.....	100
5.3.7 In vivo pharmacokinetics of the P-BER	100
5.3.8 In vitro cell viability.....	101
5.3.9 In vitro cellular uptake the P-BER.....	101
5.3.10 Flow cytometer analysis	101
5.3.11 In vivo pharmacodynamic.....	101
5.3.12 The TG content determination in liver of db/db mice	102
5.3.13 Oil red O staining.....	102
5.3.14 HE staining.....	102

5.4 Results and discussion	102
5.4.1 SEM image of the the P-BER	102
5.4.2 Particle distribution of the P-BER	103
5.4.3 Zeta value of the P-BER	104
5.4.4 In vitro time-dependent release of BER from the P-BER.....	104
5.4.5 Spray drying of the P-BER	105
5.4.6 Particle distribution and zeta value of the recovered P-BER.....	106
5.4.7 The storage stability test of the microparticles@P-BER	108
5.4.8 In vitro time-dependent drug release of BER	109
5.4.9 In vitro cell viability.....	110
5.4.10 In vitro cellular uptake the P-BER.....	111
5.4.11 Flow cytometer analysis.....	112
5.4.12 In vivo pharmacokinetics	114
5.4.13 In vivo pharmacodynamics	118
5.5 Summary.....	118
References	120
Chapter 6 Conclusions and prospect.....	122
6.1 Conclutions	122
6.2 Prospect.....	123
Publications	124
Acknowledgements	125

摘要

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病。近些年来，糖尿病患者人数在全世界范围内呈现出快速增长的趋势。虽然口服给药是最早、顺从性最好的给药方式，但是很多糖尿病药物都存在口服生物利用度低的问题，因此如何构建高效的口服药物递送系统是目前糖尿病治疗的难点和热点。

本文立足于自组装技术，围绕如何解决糖尿病药物的口服生物利用度低等诸多缺陷以及如何提高纳米粒子对糖尿病药物的负载能力、药物稳定性、药物控制释放和药物运输能力等方面的问题，设计开发了基于降血糖药物的聚合物磷脂杂化纳米粒子，并对这些体系的自组装构筑行为、药物稳定性能、药物负载能力以及药物释放和药代动力学行为以及体内外药效学做了系统研究。

本文首先构建了聚合物-磷脂杂化纳米粒 (PLGA-lipid-PEG NPs)载药系统作为胰岛素口服给药的载体体系，用于保护胰岛素，最终提高胰岛素的口服生物利用度。采用复乳法制备 INS-PLGA-lipid-PEG NPs，通过单因素考察（聚合物种类、油相浓度、超声时间以及油相水相比比例）最终确定了最优化的工艺方法和制备条件。为了进一步提高 INS-PLGA-lipid-PEG NPs 纳米粒的贮存稳定性，我们用微流射喷嘴并采用喷雾冷冻干燥方法将 INS-PLGA-lipid-PEG NPs 纳米粒悬浮液干燥成均一的微球 (micro-particles @INS-PLGA-lipid-PEG NPs)。口服灌胃糖尿病模型鼠实验表明，口服 Micro-particles@INS-PLGA-lipid-PEG NPs 组相对于注射胰岛素组的降血糖效果较为温和，生物利用度达到 12%。在纳米粒有效的保护下，糖尿病大鼠的口服胰岛素生物利用度均得到的明显的提高。

同时，我们将黄连素 (BER) 作为模型药物进行包载，并设计了 P-BER 作为口服给药的载体系统，通过单粒径喷雾干燥，将其制备为均一的 microparticles@P-BER，实验结果证明该纳米微粒具有较高的稳定性。口服 P-BER 相对于口服 BER 纯药的生物利用度达到了近 300%。说明 P-BER 显著提高了 BER 的口服吸收效率。P-BER 给药组的小鼠血糖值明显低于 BER 组以及空白组，空腹血糖值接近正常水平，提高了糖尿病治疗效果。

关键词：单分散；微粒；胰岛素；黄连素；磷脂复合物纳米粒；喷雾干燥

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.